

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

Studij medicine

Kristina Ivić

HISTOMORFOLOŠKA ANALIZA GRAĐE
JETRE MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM
TFF2 I *TFF3*

Diplomski rad

Osijek, 2016.

Rad je ostvaren u: Medicinski fakultet Osijek, Katedra za histologiju i embriologiju

Mentorica rada: prof. dr. sc. Tatjana Belovari

Rad ima 32 lista, 5 tablica i 10 slika.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Tatjani Belovari na prihvaćanju mentorstva i vođenju kroz čudnovati mikroskopski svijet jetre miševa, čime mi je omogućila nove spoznaje, na strpljenju, vremenu te pomoći u izradi i uređivanju ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem dr. sc. Nikoli Bijeliću na vremenu, savjetima, zanimljivim idejama, upoznavanju s tehnikom slikanja preparata te pomoći tijekom uređivanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom studiranja.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA	II
1. UVOD	1
1.1. Histološka građa jetre.....	1
1.2. Metabolička funkcija jetre	1
1.3. Rasprostranjenost i uloga TFF2 i TFF3 proteina.....	2
2. HIPOTEZA	5
3. CILJEVI	6
4. MATERIJAL I METODE.....	7
4.1. Ustroj studije	7
4.2. Materijal	7
4.3. Metode.....	7
4.4. Statističke metode	8
5. REZULTATI.....	9
5.1. Rezultati analize promjera jetrenih reznjica	9
5.2. Rezultati analize vezivnog tkiva	11
5.3. Rezultati analize glikogena.....	14
6. RASPRAVA.....	17
7. ZAKLJUČAK	20
8. SAŽETAK.....	21
9. SUMMARY	22
10. LITERATURA.....	23
11. ŽIVOTOPIS	27

POPIS KRATICA

TFF	obitelj trefoil faktora (engl. <i>trefoil family factor</i>)
TGF- β	transformirajući faktor rasta beta (engl. <i>transforming growth factor beta</i>)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
miRNA	mikro ribonukleinska kiselina (engl. <i>micro ribonucleic acid</i>)
PAR4	proteinazom-aktiviran receptor 4 (engl. <i>proteinase-activated receptor 4</i>)
AgRP	agouti-povezani protein (engl. <i>agouti-related peptide</i>)
Th1	tip 1 T pomoćnički (engl. <i>type 1 T helper</i>)
Th2	tip 2 T pomoćnički (engl. <i>type 2 T helper</i>)

1. UVOD

1.1. Histološka građa jetre

Osnovni građevni sastojak jetre čine jetrene stanice – hepatociti. Hepatociti se udružuju u međusobno povezane tračke ili ploče zrakasto raspoređene oko središnje vene. Takve strukture nazivaju se jetreni režnjići i čine osnovu građe jetre. Jetreni režnjići višekutna su oblika, međusobno se dodiruju i teško je odrediti točnu granicu između njih. Na njihovim uglovima smješteni su Kiernanovi portalni prostori. Unutar vezivnog tkiva portalnog prostora uloženi su venula, arteriola, žučni kanal i limfne žile (1).

U središtu jetrenih režnjića nalaze se centralno smještene vene. Okružuju ih trački i ploče hepatocita između kojih su smještene sinusoidne kapilare. Centralne vene građene su od endotelnih stanica obloženih malom količinom kolagenih vlakana. Hepatociti su stanice višekutna oblika, čija citoplazma obiluje mitohondrijima, hrapavom i glatkom endoplazmatskom mrežicom te Golgijevim kompleksima. U citoplazmi hepatocita prisutni su i lizosomi, kapljice lipida i glikogen. Stanične membrane susjednih hepatocita čine stijenu žučne kapilare u kojima žuč teče od centra prema periferiji režnjića. Žučne kapilare međusobno anastomiziraju i završavaju u žučnim kanalićima koji se ulijevaju u žučne kanale u portalnim prostorima (1).

Sinusoide su građene od endotelnih stanica, izvana obloženih nježnom ovojnicom od retikulinskih vlakana, a na luminalnoj strani nalaze se makrofazi poznati kao Kupfferove stanice. Između endotelnih stanica i hepatocita nalazi se subendotelni (Disseov) prostor te isprekidana bazalna membrana što omogućuje laku izmjenu tvari između krvne plazme unutar sinusoida i hepatocita. U Disseovu prostoru nalaze se stanice, poznate kao Itove stanice, koje pohranjuju masti i vitamin A (1).

1.2. Metabolička funkcija jetre

Jetra je vrlo važan organ bez kojeg organizam ne može preživjeti. Proizvodi žuč koja pomaže apsorbirati masti i vitamine topljive u mastima, a 95 % žučnih kiselina vraća se u jetru enterohepatičnom cirkulacijom. Većina proteina plazme sintetizira se u jetri, tako ona sudjeluje u sustavu zgrušavanja krvi, imunosnom sustavu te sintetizira transportne proteine (albumin, ceruloplazmin i dr.). Jetra svojim enzimima sudjeluje u metabolizmu bilirubina, alkohola i amonijaka, povećava topljivost egzogenih i endogenih molekula te olakšava njihovo izlučivanje iz organizma. Ima veliku ulogu u energijskom metabolizmu masti i

ugljikohidrata. U hepatocitima u periportalnom prostoru odvija se oksidativni metabolizam, katabolizam aminokiselina, metabolizam kolesterola i β -oksidacija masnih kiselina (2).

Glikogen se sintetizira u jetri i mišićima. Regulacija metabolizma glikogena pod kontrolom je dvaju enzima – glikogen fosforilaze i glikogen sintaze. Inzulin i glukoza potiču sintezu glikogena te koče njegovu razgradnju. Razgradnju glikogena potiču adrenalin, vazopresin, oksitocin i angiotenzin II (3).

1.3. Rasprostranjenost i uloga TFF2 i TFF3 proteina

Obitelj trefoil faktor proteina sastoji se od triju proteina: TFF1, 2 i 3. Trefoil faktor proteini mali su sekretorni proteini pronađeni u probavnom sustavu, a njihova mRNA otkrivena je u i plućima, dušniku, prostati, vagini, štitnjači, žlijezdama slinovnicama, mozgu i drugim organima (4). Geni koji ih kodiraju nalaze se na 21. kromosomu (5). Zbog svoje lokalizacije bili su proučavani kod osoba s trisomijom 21. kromosoma, no nije pronađeno značajno povišenje razine TFF proteina u fetalnom mozgu koje bi upućivalo na njih kao uzroke morfološkog defekta osoba s Downovim sindromom niti se mogu koristiti za probir novorođenčadi na trisomiju 21. kromosoma (6). Međutim, dinamične promjene trefoil faktor proteina u serumu trudnice upućuju na njihovu važnost tijekom embriogeneze (7). Dokazana je prisutnost TFF3 proteina u hrskavici tijekom enhondralnog okoštavanja u fetusu miševa, a isključenje *TFF3* gena dovodi do promjene u histomorfološkoj građi spužvaste kosti, poremećaja sluha i ubrzane presbiakuzije što ukazuje na njegovu ulogu u morfogenezi organa (8-10).

Miševi s isključenim *TFF2* genom drugačije eksprimiraju miRNA koje su u uskoj povezanosti s karcinomom pankreasa, bazalnih stanica, kolorektalnim karcinomom, metabolizmom ugljikohidrata te signalnim putem adipocitokina (leptina) (11). TFF2 protein pojačano je eksprimiran u kolorektalnom karcinomu čovjeka te djelovanjem na aktivnost proteinazom-aktiviranog receptora 4 (PAR4) dovodi do migracije stanica i metastaza (12). Osim na migraciju, TFF2 protein utječe i na proliferaciju, npr. β -stanica u gušterači i stanica retine (13, 14). Istraživanja pokazuju da isključenje *TFF2* gena dovodi do promjene u energetske metabolizmu miševa. Nedostatak *TFF2* gena u hipotalamusu povezan je s povećanom razinom agouti-povezanog proteina (AgRP), koji je aktivator apetita, te dovodi do pojačanog uzimanja hrane. Unatoč povećanom kalorijskom unosu, miševi s isključenim *TFF2* genom imaju manju masu i količinu masnog tkiva od divljeg tipa miša te nižu razinu leptina u

serumu. Gubitku mase pridonose povećan gubitak masti stolicom i hipermotorička aktivnost miševa, no vjerojatnije je riječ o nesposobnosti pohrane energije (15).

Kod miševa s isključenim *TFF2* genom uočena je razlika u imunom sustavu u odnosu na divlji tip. U miševa kojima je isključen *TFF2* gen dolazi do jačeg Th1 odgovora limfocita (16). TFF2 protein suprimira Th1 odgovor pomagačkih limfocita miša i pogoduje imunološkom Th2 odgovoru limfocita te tako sudjeluje u patogenezi astme i odgovoru na infekciju (17). Miševi s isključenim *TFF2* genom hiperreaktivno odgovaraju na infekciju te bolje podnose infekciju malim brojem parazita Toksoplazme gondii od miševa divljeg tipa, no ne i velikim brojem parazita, a zbog poremećaja Th2 odgovora vrlo teško podnose infekciju helmintima (17, 18).

Promjena razine u izražaju *TFF* gena uočena je tijekom oporavka miševa od ozljeda pluća naftalenom (19). Intravenski primijenjen rekombinantni TFF2 protein štiti želučanu sluznicu od ozljede etanolom, a isključenje TFF2 gena dovodi do puno težeg upalnog odgovora na kolitis uzrokovan dekstran natrij sulfatom (20, 16).

Isključivanje *TFF2* gena utječe na izražaj *TFF3* gena. Kod miševa s isključenim *TFF2* genom došlo je do povećanog izražaja *TFF3* gena u slezeni i timusu, a u crijevima do smanjenja izražaja *TFF3* gena (21).

Utjecaj trefoil faktor proteina na energijski metabolizam vidljiv je i kod miševa kojima je isključen *TFF3* gen. Miševi s isključenim *TFF3* genom drugačije eksprimiraju miRNA koje su u vezi s metaboličkim putevima glikolize i glukoneogeneze od miševa divljeg tipa (22). U istom istraživanju uočeno je da miševi s isključenim *TFF3* genom imaju značajno manju tjelesnu masu u odnosu na divlji tip, dok u istraživanju s pojačanim izražajem *TFF3* gena promjena tjelesne mase nije prisutna (23). Masna promjena jetre miševa povezana je s promjenom u izražaju *TFF3* gena (24). Istraživanja su pokazala da TFF3 protein sudjeluje u metabolizmu glukoze te je reguliran glukozom i inzulinom. U jetri pretilih miševa dolazi do smanjenja izražaja *TFF3* gena, a adenovirusom povećan izražaj *TFF3* gena u jetri pretilih miševa i miševa koji su razvili dijabetes dovodi do smanjenja izražaja gena glukoneogeneze, smanjene sinteze glukoze te bolje tolerancije glukoze (25). Glukoza i inzulin dovode do povećanja izražaja *TFF3* gena. Niske razine TFF3 proteina u serumu pronađene su kod bolesnika koji imaju diabetes mellitus tipa 1, a terapija inzulinom smanjuje razinu glukoze u krvi te povećava izražaj *TFF3* gena (26).

Osim *TFF2*, i *TFF3* gen sudjeluje u proliferaciji stanica gušterače – smanjeni izražaj *TFF3* gena dovodi do smanjenog umnažanja β -stanica gušterače, a povećani izražaj dovodi do povećanog umnažanja β -stanica gušterače bez utjecaja na njihovu funkciju (27). Osim

utjecaja na stanični ciklus, TFF3 protein povezuje se i s angioneogeneom što ga čini bitnim faktorom u patogenezi tumora (28). Istraživanja su dokazala povećanu ekspresiju *TFF3* gena u tumorima gastrointestinalnog sustava, pluća, uznapredovalom karcinomu prostate, hepatocelularnom karcinomu i drugim tumorima (29-32). Izražaj *TFF3* gena ima prediktivnu ulogu u tumorima dojke, a uočen je i kao vrijedan biomarker za skrining tumora želuca (33, 34).

TFF3 protein također je bitan u borbi organizma protiv štetnih čimbenika. Miševi koji u svojoj jetri ne mogu sintetizirati dovoljno TFF3 proteina, zato što im je gen isključen ili jetra djelomično resecirana, zakinuti su za protektivni učinak TFF3 proteina u serumu nakon ishemije miokarda i mozga te posljedično dolazi do većeg oštećenja tkiva (35, 36). Miševi isključenog *TFF3* gena imaju poteškoće s obnavljanjem sluznice gastrointestinalnog trakta i rožnice (37, 38).

2. HIPOTEZA

Postoji značajna razlika u histomorfološkoj građi jetre između miša s isključenim *TFF2* genom, miša s isključenim *TFF3* genom te divljeg tipa miša.

3. CILJEVI

Ciljevi su ovoga istraživanja:

- utvrditi postoje li značajne razlike u promjeru jetrenih režnjića miševa divljeg tipa i miševa kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen;
- utvrditi postoje li razlike u vezivnom tkivu miševa divljeg tipa i miševa kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen;
- utvrditi postoje li značajne razlike s obzirom na prisutnost glikogena između stanica jetre miševa divljeg tipa i miševa kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Ustroj studije

Preparati jetre miševa s isključenim *TFF2*, miševa s isključenim *TFF3* genom (eksperimentalne skupine) te miševa divljeg tipa (kontrolna skupina) analizirani su svjetlosnim mikroskopom kvalitativno, kvantitativno i semikvantitativno. Kvalitativna analiza obuhvaćala je histomorfološko proučavanje građe jetre, prisutnost i količinu vezivnog tkiva u jetri miševa divljeg tipa i miševa s isključenim *TFF2* i *TFF3* genima, te njihovu međusobnu usporedbu. Kvantitativna analiza obuhvaćala je mjerenje promjera jetrenih režnjića pomoću računalnog programa kako bi se utvrdilo postoje li značajne statističke razlike između kontrolne skupine i dviju eksperimentalnih skupina. Semikvantitativna analiza obuhvaćala je brojanje stanica pozitivnih na glikogen, od ukupno 100 stanica u vidnom polju, te usporedbu između gore navedenih skupina.

4.2. Materijal

Istraživanje je provedeno na histološkim uzorcima jetre iz arhive Katedre za histologiju i embriologiju. Korišteni su preparati jetre divljeg tipa miša i jetre miševa s isključenim genom *TFF2* i *TFF3*, starih 6 mjeseci. Korišteno je 6 miševa po skupini (ukupno 18). Životinje su žrtvovane u sklopu projekta „Uloga malih zaštitnih TFF proteina u zdravlju i bolesti“, voditeljice prof. dr. sc. Tatjane Belovari, šifra 219-0982914-2179.

4.3. Metode

Jetre miševa fiksirane su te uklopljene u parafinske blokove. Parafinski blokovi izrezani su na serijske rezove debljine 6 µm, pomoću mikrotoma marke Reichert-Jung 2400, koji su potom nanoseni na predmetna stakalca te obojeni hemalaun-eozinom, Mallory i PAS metodom (ukupno 54 preparata). Hemalaun jezgre stanica oboji plavo, a eozin citoplazmatske proteine, kolagen i crvene krvne stanice oboji crvenkasto. Mallory trikromno bojenje koristilo se za prikaz kolagena u vezivnom tkivu koje se obojilo plavo, a citoplazma, elastična vlakna i krvne stanice ružičasto. PAS metodom zrnca glikogena u citoplazmi oboje se ružičasto do crvenoljubičasto.

Histomorfološka analiza građe jetre provedena je na preparatima obojenim hemalaun-eozinom. Vezivno tkivo jetre miševa pregledano je na preparatima obojenim Mallory metodom te kvalitativno opisano. Analiza prisutnosti glikogena u jetrenim stanicama

provedena je na uzorcima obojenim PAS metodom. Izabirana su područja najjačeg signala na preparatu i zatim je, uz povećanje 400 x, odabrano područje od 100 stanica. Zabilježeno je koliko je stanica jetre od prebrojanih 100 stanica pozitivno na glikogen. Za prebrojanih do 35 pozitivnih stanica pridružena je vrijednost jedan plus (slab signal), za prebrojanih 36 do 70 dva plusa (srednje jak signal); ako je u promatranom području od 100 stanica prebrojana 71 ili više njih pozitivnih na glikogen, pridružena je vrijednost od tri plusa (jak signal).

S obzirom na to da su granice režnjića bile najvidljivije na preparatima obojenima PAS metodom, ti su preparati izabrani kako bi se na njima izmjerio promjer jetrenih režnjića. Jetreni režnjići pregledani su uz povećanje 40 x, izabiralo se po 5 reprezentativnih režnjića kojima se granice jasno vide. Režnjići jetre fotografirani su uz povećanje 100 x, fotoaparatom marke Olympus, model C-5050, spojenim na mikroskop marke Olympus, model BX-50, uz pomoć računalnog programa QuickPHOTO Pro. Na fotografijama je zatim pomoću istog programa izmjeren dulji i kraći promjer jetrenih režnjića (izražen u μm).

4.4. Statističke metode

Numerički podatci koji slijede normalnu raspodjelu prikazani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Razlike među nezavisnim skupinama (3 skupine) testirane su Studentovim t testom. Ordinalne varijable analizirane su Mann-Whitneyevim U testom. Za statističku obradu korišten je program SPSS (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, inačica 22.0. Armonk, NY: IBM Corp). Sve su P vrijednosti dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$.

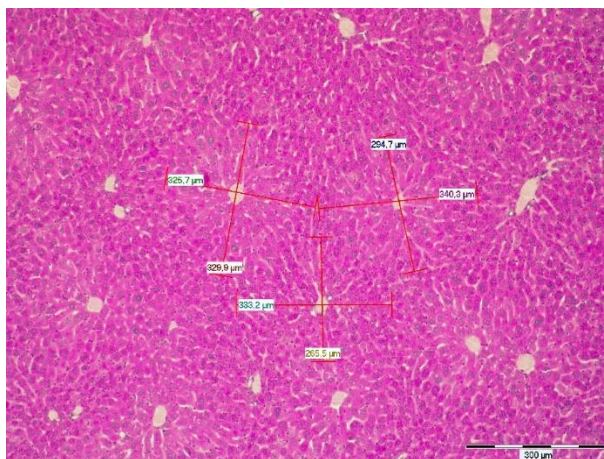
5. REZULTATI

U ovom radu analizirana je građa jetre triju skupina miševa: divlji tip miša, miševi s isključenim *TFF2* genom i miševi s isključenim *TFF3* genom. U svakoj od tih triju skupina napravljena su mjerenja za šest različitih miševa kako bi se utvrdilo postoji li značajna histomorfološka razlika u građi jetre između miševa s isključenim *TFF2* i *TFF3* genom te divljeg tipa miša.

Analizom uzoraka obojenim hemalaun-eozinom nađena je normalna histološka građa kod sva tri tipa miša. Vidjeli su se jetreni režnjići izgrađeni od poligonalnih hepatocita između kojih su bile sinusoidne kapilare. U svim trima skupinama nađena su područja s masnim kapljicama.

5.1. Rezultati analize promjera jetrenih režnjića

U svakom uzorku napravljeno je mjerenje (Slika 1) pet različitih reprezentativnih režnjića, tako da za svaku skupinu postoji trideset uzoraka (ukupno 90). Za svaki jetreni režnjić izmjereno je manji i veći promjer, pri čemu je za analizu rezultata upotrijebljena aritmetička sredina.



Slika 1. Prikaz načina mjerenja promjera jetrenih režnjića.

Shapiro-Wilkovim testom ispitana je normalnost distribucije varijabli. Razina značajnosti postavljena je na $\alpha = 0,05$. Sve su vrijednosti značajnosti testa (p) iznad zadane α granice (Tablica 1). Iz toga se može zaključiti da nema statistički značajne razlike između normalne distribucije i distribucije vrijednosti promjera režnjića svih triju skupina miševa.

Tablica 1. Shapiro-Wilkov test normalnosti raspodjele promjera jetrenih režnjića

Skupina miševa	* p
Divlji tip	0,247
Miševi s isključenim <i>TFF2</i> genom	0,138
<i>TFF3</i> s isključenim <i>TFF3</i> genom	0,392

* – značajnost testa

Jetreni režnjići miševa s isključenim *TFF2* genom i miševa s isključenim *TFF3* genom bili su manji od režnjića divljeg tipa miša (Tablica 2). Statističkom obradom podataka utvrđeno je da postoji značajna razlika u promjerima jetrenih režnjića između divljeg tipa miša i miševa kojima je isključen *TFF2* gen, te između divljeg tipa miša i miševa kojima je isključen *TFF3* gen (Tablica 3). Razlika u promjerima jetrenih režnjića između miševa kojima je isključen *TFF2* gen i miševa kojima je isključen *TFF3* gen nije značajna (Tablica 3).

Tablica 2. Deskriptivne vrijednosti promjera jetrenih režnjića za sve skupine miševa.

		Divlji tip	Miševi s isključenim <i>TFF2</i> genom	Miševi s isključenim <i>TFF3</i> genom
Aritmetička sredina		370,9	331,5833	324,1167
95 % interval pouzdanosti za aritmetičku sredinu	Donja granica	344,4391	309,0665	304,5667
	Gornja granica	397,3609	354,1001	343,6666
Standardna devijacija (σ)		70,86369	60,30112	52,35566
Minimum		254,5	226,5	230,5
Maksimum		514,5	508,5	423,5
Raspon vrijednosti		260	282	193

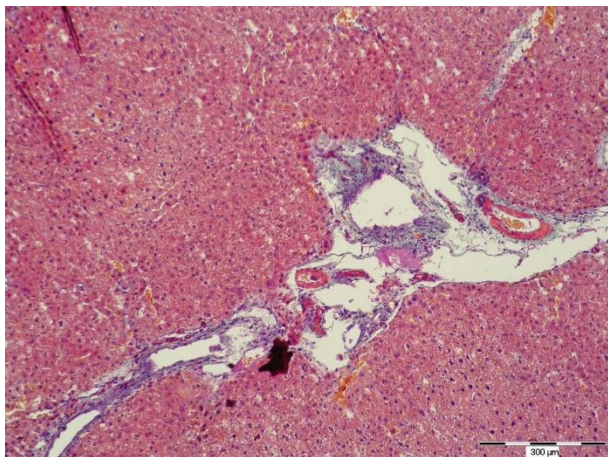
Tablica 3. Statistička analiza značajnosti razlike između 3 skupine miševa – Studentov t test

Uspoređivani tipovi miševa		*p	Razlika aritmetičkih sredina
[†] Divlji tip	[‡] TFF2	0,024	39,31667
[‡] TFF2	[§] TFF3	0,611	7,46667
[†] Divlji tip	[§] TFF3	0,005	46,7833

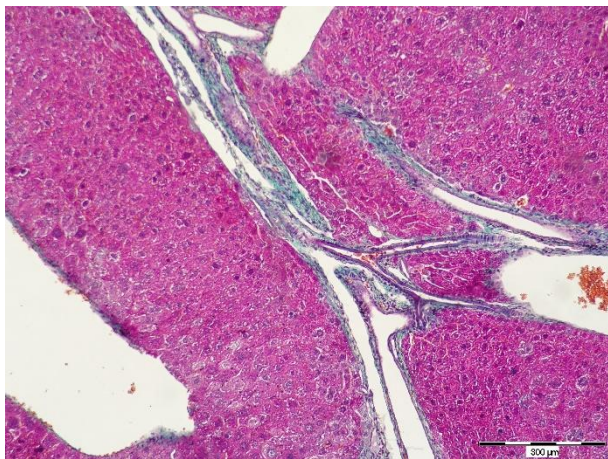
* – vrijednost značajnosti testa, [†] – skupina miševa divljeg tipa, [‡] – skupina miševa kojima je isključen *TFF2* gen, [§] – skupina miševa kojima je isključen *TFF3* gen

5.2. Rezultati analize vezivnog tkiva

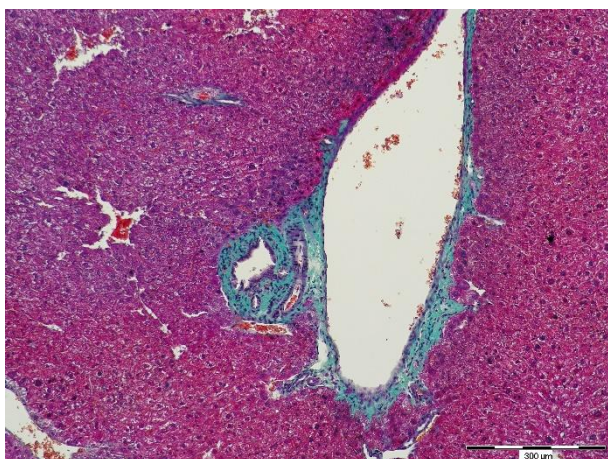
Na preparatima obojenim Mallory metodom uočena je razlika u količini vezivnog tkiva miševa divljeg tipa i miševa kojima su isključeni *TFF2* i *TFF3* geni. Vezivno tkivo jetre miševa divljeg tipa bilo je vidljivo u portalnim prostorima (Slika 2), ali ne i unutar režnjića (Slika 5). Miševi kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen imali su više vezivnog tkiva u portalnim prostorima jetre (Slika 3 i Slika 4) od divljeg tipa miša, a osim u portalnim prostorima uočeno je vezivno tkivo i unutar jetrenih režnjića u području sinusoida (Slika 6 i Slika 7).



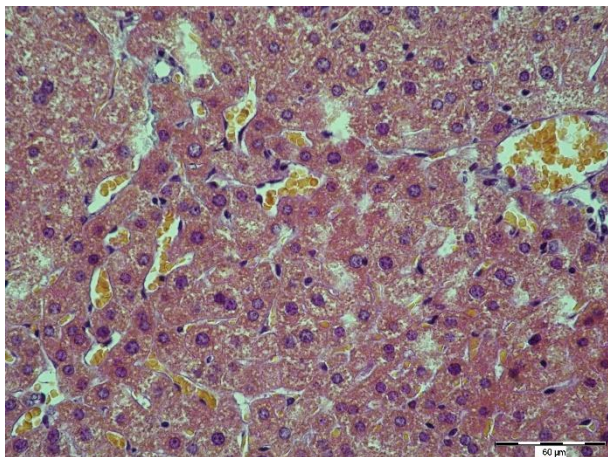
Slika 2. Prikaz vezivnog tkiva portalnog prostora jetre divljeg tipa miša. Bojenje Mallory metodom; mjerilo 300 μm.



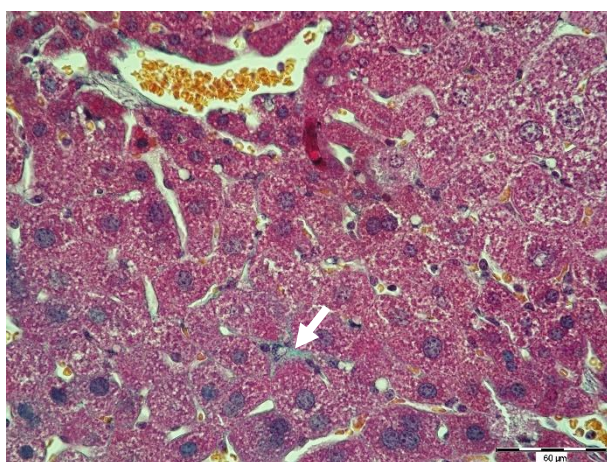
Slika 3. Prikaz vezivnog tkiva portalnog prostora miša s isključenim *TFF2* genom. Bojenje Mallory metodom; mjerilo 300 μm.



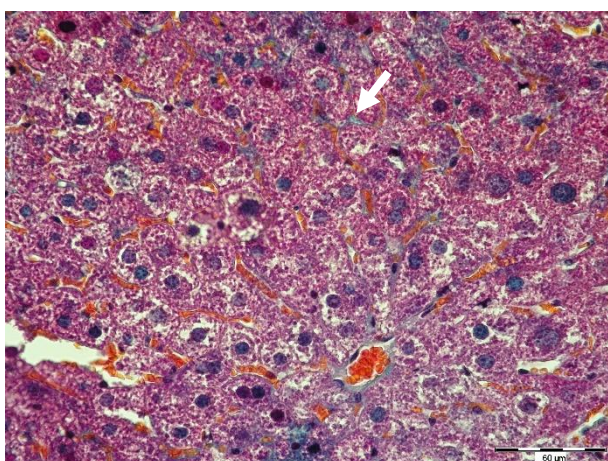
Slika 4. Prikaz vezivnog tkiva portalnog prostora miša s isključenim *TFF3* genom. Bojenje Mallory metodom; mjerilo 300 μm.



Slika 5. Prikaz jetrenog režnjića divljeg tipa miša. Bojenje Mallory metodom; mjerilo 60 μm.



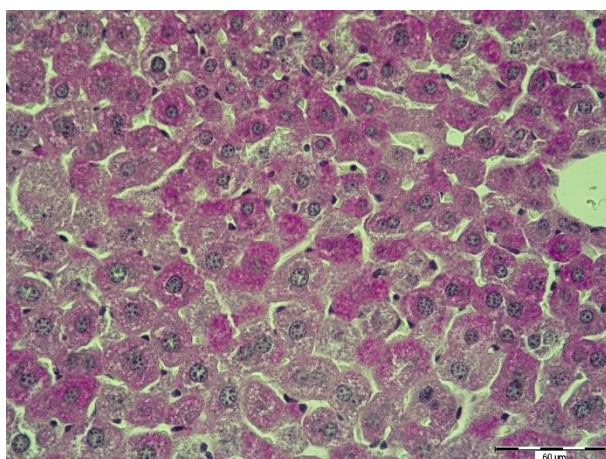
Slika 6. Prikaz vezivnog tkiva jetrenog režnjića miša kojemu je isključen *TFF2* gen (označeno strelicom). Bojenje Mallory metodom; mjerilo 60 μm.



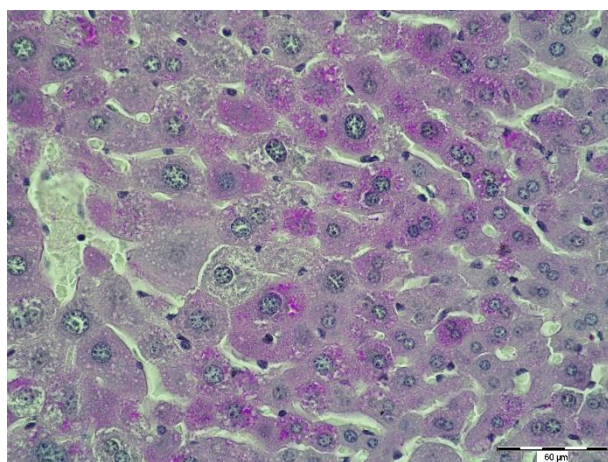
Slika 7. Prikaz vezivnog tkiva jetrenog režnjića miša kojemu je isključen *TFF3* gen (označeno strelicom). Bojenje Mallory metodom; mjerilo 60 μm.

5.3. Rezultati analize glikogena

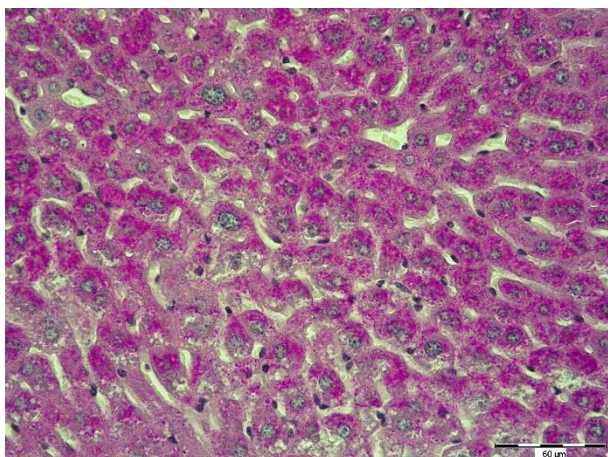
Prilikom analize glikogena na preparatima obojenim PAS metodom uočeno je da su stanice miševa s isključenim *TFF3* genom krcate glikogenom (Slika 10), dok divlji tip miša (Slika 8) i miševi s isključenim *TFF2* genom (Slika 9) imaju manje zrnaca glikogena u stanicama koja su se prikazala PAS metodom.



Slika 8. Prikaz ispunjenosti stanica glikogenom kod miša divljeg tipa. Bojenje PAS metodom; mjerilo 60 μm.



Slika 9. Prikaz ispunjenosti stanica glikogenom kod miša s isključenim *TFF2* genom. Bojenje PAS metodom; mjerilo 60 μm.



Slika 10. Prikaz ispunjenosti stanica glikogenom kod miša s isključenim *TFF3* genom. Bojenje PAS metodom; mjerilo 60 μm .

Za analizu jakosti signala glikogena promatran je broj stanica koje u sebi imaju glikogen. Uočeno je da je u skupini divljeg tipa miša najveći broj uzoraka imao srednje jak signal (++), dok je u skupini miševa s isključenim *TFF3* genom bio prisutan samo jaki signal (+++). U skupini miševa kojima je isključen *TFF2* gen bile su prisutne sve jačine signala glikogena, no niti jedna nije dominantna kao u ostala dva tipa miša (Tablica 4).

Tablica 4. Jačina signala glikogena različitih skupina miševa

	Jačina signala glikogena		
	*+	†++	‡+++
§Divlji tip	0	5	1
†TFF2	1	2	3
¶TFF3	0	0	6

* – broj miševa koji imaju slab signal glikogena, † – broj miševa koji imaju umjereno jak signal glikogena, ‡ – broj miševa koji imaju jak signal glikogena, § – skupina miševa divljeg tipa, † – skupina miševa kojima je isključen *TFF2* gen, ¶ – skupina miševa kojima je isključen *TFF3* gen

Statistička analiza pokazala je da postoji značajna razlika u jačini signala glikogena između skupine miševa divljeg tipa i miševa kojima je isključen *TFF3* gen, dok se skupina miševa kojima je isključen *TFF2* gen ne razlikuje značajno od skupine miševa divljeg tipa ili miševa kojima je isključen *TFF3* gen (Tablica 5).

Tablica 5. Statistička obrada podataka koji opisuju jakost signala glikogena Mann-Whitneyjevim U testom

Uspoređivani tipovi miševa		* p
†Divlji tip	‡TFF2	0,523
‡TFF2	§TFF3	0,058
†Divlji tip	§TFF3	0,005

* – vrijednost značajnosti testa, † – skupina miševa divljeg tipa ‡ – skupina miševa kojima je isključen *TFF2* gen, § – skupina miševa kojima je isključen *TFF3* gen

6. RASPRAVA

Svrha ovoga istraživanja bila je istražiti postoje li razlike u građi jetre između miševa s isključenim *TFF2* i *TFF3* genom i miševa divljeg tipa. Ranije je uočena ekspresija TFF3 proteina tijekom enhondralnog okoštavanja i dokazana je histomorfološka razlika u građi kosti između miševa kojima je isključen *TFF3* gen i divljeg tipa miša, no nije poznato odražavaju li se te promjene na funkciju kosti (8, 9). Do sada nije istražen utjecaj nijednog od TFF proteina na histomorfologiju jetre. Zanimalo nas je razlikuju li se miševi kojima je isključen *TFF2* ili *TFF3* gen od miševa divljeg tipa po duljini promjera jetrenog reznjica i količini vezivnog tkiva u jetri. Povezanost trefoil faktor proteina s metabolizmom glukoze dovela je do pitanja utječu li TFF2 i TFF3 proteini na pohranu glikogena u jetri, odnosno kako se u tom kontekstu razlikuju miševi kojima je isključen gen za TFF2 ili TFF3 protein od miševa divljeg tipa.

U ovom istraživanju dokazano je da postoje histomorfološke razlike u jetri između divljeg tipa miša, miša kojemu je isključen *TFF2* gen i miša kojemu je isključen *TFF3* gen. Kvantitativnom analizom utvrđeno je da je promjer jetrenih reznjica miševa s isključenim *TFF2* i *TFF3* genom manji od onog u divljem tipu miša, no razlika u promjerima jetrenih reznjica između dviju eksperimentalnih skupina nije značajna. S obzirom na poznati utjecaj TFF proteina na migraciju i proliferaciju epitelnih stanica, postoji mogućnost da su uočene promjene u promjerima reznjica posljedica izostanka funkcije isključenog TFF gena (39).

Miševi kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen imali su više vezivnog tkiva u jetrenim reznjicama od miševa divljeg tipa. Vezivno tkivo unutar jetrenog reznjica miševa divljeg tipa na preparatima obojenima Mallory metodom nije bilo vidljivo, dok je na preparatima obiju eksperimentalnih skupina prikazano. Nije uočena razlika u količini vezivnog tkiva između skupine miševa s isključenim *TFF2* genom i skupine miševa s isključenim *TFF3* genom. Nije poznat razlog ovog nakupljanja veziva unutar jetrenih reznjica životinja s isključenim *TFF2*, odnosno *TFF3* genom. Međutim, nakon akutne ozljede pluća naftalenom miševa kojima je isključen *TFF2* gen u prva 24h ne dolazi do većih promjena u debljini subepitelnog kolagena u odnosu na divlji tip miša, no nakon 74h njihovo je subepitelno vezivno tkivo deblje te imaju veću razinu profibroznog čimbenika TGF- β . Suprotno, primjena TFF2 proteina nakon ozljede dovela je do manjeg subepitelnog odlaganja kolagena i kod miševa divljeg tipa i kod miševa kojima je isključen *TFF2* gen, u odnosu na miševe koji nisu tretirani rekombinantnim TFF2 proteinom (40). Do sada nije istražen utjecaj trefoil faktor proteina na vezivno tkivo jetre te je

u ovom istraživanju kvalitativno analizirano vezivno tkivo miševa s isključenim *TFF2* i *TFF3* genom. U idućim istraživanjima trebalo bi kvantitativno analizirati razlike u količini vezivnog tkiva jetre kod miševa s isključenim *TFF* genima i miševa divljeg tipa. Osim toga, trebalo bi ispitati ulogu trefoil faktor proteina u reparacijskim procesima jetre nakon djelovanja štetnih čimbenika. Ove spoznaje mogle bi biti vrijedne u istraživanju patološkog odlaganja vezivnog tkiva u jetri (npr. kod ciroze jetre).

Analizom promjera jetrenih režnjića i vezivnog tkiva jetre uočeno je da su rezultati kod miševa kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen vrlo slični. Miševi kojima je isključen *TFF2* gen drukčije eksprimiraju *TFF3* gen u slezeni, timusu i debelom crijevu, stoga takvi rezultati u jetri mogu biti posljedica bliskog smještaja ovih gena na kromosomu i međusobnog utjecaja na ekspresiju, ili sličnog mehanizma djelovanja (21). Za sada nije utvrđeno dolazi li do promjene ekspresije jednog od ova dva trefoil faktor proteina u jetri ukoliko se drugi isključi.

U ovom istraživanju semikvantitativnom analizom glikogena u jetri utvrđeno je da miševi s isključenim *TFF3* genom imaju više glikogena u jetri nego miševi s isključenim *TFF2* genom i divlji tip miša. Osim što ima više stanica pozitivnih na glikogen, ima i više glikogena u samim stanicama te su kod miševa isključenog *TFF3* gena gotovo sve stanice krcate glikogenom, dok je kod divljeg tipa miša većina stanica samo djelomično ispunjena. Pohrana glikogena ovisi o razdobljima gladovanja miševa, razinama inzulina, glukoze u krvi i prekursorima glukoneogeneze (41). Životinjama u ovom istraživanju hrana je bila dostupna *ad libidum*, tako da bi dobiveni rezultati mogli biti posljedica tih faktora, ali i mogućeg direktnog utjecaja TFF3 proteina na glikogenezu. Uloga trefoil faktor proteina u metabolizmu glukoze potaknula je istraživanja koja bi objasnila njihovu ulogu te ispitala mogućnost korištenja tih spoznaja u razvoju lijekova za diabetes mellitus. Dosadašnja su istraživanja TFF3 proteina pokazala da adenovirusom povećani izražaj *TFF3* gena u jetri pretilih miševa i miševa koji su razvili dijabetes dovodi do smanjenja ekspresije gena glukoneogeneze, smanjene sinteze glukoze te bolje tolerancije glukoze (25). Niske razine TFF3 proteina u serumu pronađene su kod bolesnika koji imaju diabetes mellitus tipa 1, a terapija inzulinom smanjuje razinu glukoze u krvi te povećava izražaj *TFF3* gena (26). Za sada nije poznato kako isključivanje *TFF3* gena utječe na glukoneogenezu, te bi u idućim istraživanjima trebalo utvrditi imaju li takvi miševi povećanu ekspresiju gena glukoneogeneze, veće razine glukoze i inzulina u krvi te posljedično povećanu pohranu glikogena.

Uočeno je da skupina miševa s isključenim *TFF2* genom ima više glikogena u jetri od divljeg tipa miša, a manje glikogena od miševa s isključenim *TFF3* genom, no te razlike nisu

bile statistički značajne. Uvidom u rezultate, vidljivo je da je jakost signala ipak bliža divljem tipu miša nego miševima isključenog *TFF3* gena. To navodi na zaključak da bi se na većem uzorku, i uz korištenje dodatnih metoda kvantifikacije, mogli dobiti detaljniji podatci.

Rezultati ovog istraživanja u skladu su s dosadašnjim spoznajama, koje pokazuju da TFF2 i TFF3 proteini imaju ulogu u metabolizmu jetrenih stanica (25). Moguće je i da utječu na proliferaciju i migraciju jetrenih stanica prilikom razvoja jetre. Zajedno s rezultatima koji pokazuju povećanje količine veziva u životinja s isključenim genima za TFF2 i TFF3 protein, ove činjenice otvaraju nekoliko zanimljivih mogućnosti za daljnja istraživanja ovih proteina u fiziološkim i patološkim procesima u jetri.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- postoji značajna razlika u promjerima jetrenih režnjića miševa divljeg tipa i miševa kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen, ali ne i između miševa kojima je isključen *TFF2* i miševa kojima je isključen *TFF3* gen; miševi kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen imaju manji promjer jetrenih režnjića od miševa divljeg tipa;
- postoji razlika u količini vezivnog tkiva miševa divljeg tipa i skupina miševa kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen, ali ne i između miševa kojima je isključen *TFF2* i miševa kojima je isključen *TFF3* gen; skupine miševa kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen imaju vezivno tkivo u jetrenim režnjićima koje nije uočeno kod miševa divljeg tipa;
- postoji značajna razlika s obzirom na prisutnost glikogena između jetre miševa divljeg tipa i miševa kojima je isključen *TFF3* gen; miševi isključenog *TFF3* gena imaju značajno više glikogena u jetri nego miševi divljeg tipa. Nije pronađena statistički značajna razlika između miševa kojima je isključen *TFF2* gen i divljeg tipa miša ili miša kojem je isključen *TFF3* gen.

8. SAŽETAK

CILJEVI ISTAŽIVANJA. Ciljevi ovoga istraživanja bili su utvrditi postoje li razlike u promjerima jetrenih režnjića miševa, vezivnom tkivu jetre te u prisutnosti glikogena u jetri divljeg tipa i miševa kojima su isključeni *TFF2* i *TFF3* geni.

USTROJ STUDIJE. Preparati jetre analizirani su svjetlosnim mikroskopom kvalitativno, kvantitativno mjerenjem promjera jetrenih režnjića, a semikvantitativno je određena jačina signala glikogena.

MATERIJAL I METODE. Istraživanje je provedeno na jetri miševa divljeg tipa i jetre miševa s isključenim genom *TFF2* i *TFF3*. Preparati jetre su bojani trima različitim bojenjima – hemalaun i eozinom, PAS bojenjem i Mallory metodom. Izmjereni su promjeri jetrenih režnjića te je brojanjem pozitivnih stanica određena količina glikogena. Kvalitativno je opisana količina vezivnog tkiva u jetrenim režnjićima.

REZULTATI. Miševi kojima je isključen *TFF2* gen i miševi kojima je isključen *TFF3* gen imali su značajno manji promjer jetrenih režnjića nego miševi divljeg tipa. Miševi s isključenim *TFF2* i *TFF3* genom imali su više vezivnog tkiva u jetrenim režnjićima nego miševi divljeg tipa. Miševi s isključenim *TFF3* genom imali su više stanica pozitivnih na glikogen od miševa s isključenim *TFF2* genom i miševa divljeg tipa, koji se međusobno nisu statistički razlikovali po količini glikogena.

ZAKLJUČAK. Postoje značajne histomorfološke razlike u građi jetre divljeg tipa i miševa kojima je isključen *TFF2* i *TFF3* gen – u promjeru režnjića, količini glikogena u stanicama te vezivnog tkiva u režnjićima.

KLJUČNE RIJEČI. glikogen; histomorfologija; jetra; *TFF2*; *TFF3*; vezivno tkivo.

9. SUMMARY

Histomorphological analysis of liver structure in TFF2 and TFF3 knock out mice

OBJECTIVES: The objectives of this study were to determine if there are differences in the diameter length of hepatic lobules, hepatic connective tissue and the presence of glycogen in the liver of wild type mice and TFF2 and TFF3 knock-out mice.

STUDY DESIGN: Liver slides were analyzed under a light microscope qualitatively, quantitatively by measuring the diameter of hepatic lobules, with the glycogen signal strength being determined semi quantitatively.

MATERIAL AND METHODS: The study was carried out on liver of wild type mice and TFF2 and TFF3 knock-out mice. The liver slides were stained with three different methods – hemalaun and eosin, PAS staining, and Mallory method. The diameters of hepatic lobules were measured, and glycogen quantity was determined by counting the positive cells. The amount of connective tissue in hepatic lobules was described qualitatively.

RESULTS: TFF2 and TFF3 knock-out mice had significantly smaller diameter of hepatic lobules compared to wild type mice. More connective tissue was found in TFF2 and TFF3 knock-out mice compared to wild type mice. TFF3 knock-out mice had more glycogen-positive cells than TFF2 knock-out mice and wild type mice, whose glycogen amounts did not differ statistically.

CONCLUSION: There are significant histomorphological differences in liver structure of wild type mice and TFF2 and TFF3 knock-out mice – in the diameter of hepatic lobules, amount of cell glycogen and connective tissue in the lobules.

KEYWORDS: connective tissue; glycogen; histomorphology; liver; TFF2; TFF3.

10. LITERATURA

1. Junqueira LC, Carneiro J. Osnove histologije. 10. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
2. Ginès P, Kamath PS, Arroyo V. Chronic liver failure: Mechanisms and Management. 18. izd. New York: Springer; 2011.
3. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Harperova ilustrirana biokemija. 28. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
4. Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factors 1, 2, and 3. *J Histochem Cytochem.* 2007;55(5):505-13.
5. Gött P, Beck S, Machado JC, Carneiro F, Schmitt H, Blin N. Human trefoil peptides: genomic structure in 21q22.3 and coordinated expression. *EJHG* 1996;4(6):308–315
6. Cheon MS, Shim KS, Kim SH, Hara A, Lubec G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain: Challenging the gene dosage effect hypothesis. *Amino Acids.* 2003;25(1):41-7.
7. Samson MH, Vestergaard EM, Milman N, Poulsen SS, Nexø E. Circulating serum trefoil factors increase dramatically during pregnancy. *Scand J Clin Lab Invest.* 2008;68(5):369-74.
8. Bijelić N, Belovari T, Baus Lončar M. Trefoil factor family protein 3 (TFF3) is present in cartilage during endochondral ossification in the developing mouse fetus. *Acta Histochem.* 2013;115(3):204-8.
9. Bijelić N, Perić Kačarević Ž, Belovari T, Radić R. Trefoil factor family protein 3 affects cancellous bone formation in the secondary centers of ossification of mouse tibiae. *Periodicum biologicum.* 2015;117(1):59-64.
10. Lubka M, Müller M, Baus-Lončar M, Hinz M, Blaschke K, Hoffmann W, i sur. Lack of Tff3 peptide results in hearing impairment and accelerated presbycusis. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(5-6):437-44.
11. Shah AA, Leidinger P, Keller A, Wendschlag A, Meese E, Blin N. Altered miRNA expression patterns in Tff2 knock-out mice correlate with cellular pathways of neoplastic development and caloric metabolism. *International journal of molecular medicine.* 2011;29:637-643.
12. Yu G, Jiang P, Xiang Y, Zhang Y, Zhu Z, Zhang C. Increased Expression of Protease-Activated Receptor 4 and Trefoil Factor 2 in Human Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2015 Apr 13;10(4):e0122678.

13. Orime K, Shirakawa J, Togashi Y, Tajima K, Inoue H, Ito Y, i sur. Trefoil factor 2 promotes cell proliferation in pancreatic β -cells through CXCR-4-mediated ERK1/2 phosphorylation. *Endocrinology*. 2013;154(1):54-64.
14. Paunel-Görgülü AN, Franke AG, Paulsen FP, Dünker N. Trefoil factor family peptide 2 acts pro-proliferative and pro-apoptotic in the murine retina. *Histochem Cell Biol*. 2011;135(5):461-73.
15. De Giorgio MR, Yoshioka M, Riedl I, Moreault O, Cherizol RG, Shah AA, i sur. Trefoil factor family member 2 (Tff2) KO mice are protected from high-fat diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)*. 2013;21(7):1389-95.
16. Kurt-Jones EA, Cao LC, Sandor F, Rogers AB, Whary MT, Nambiar PR, i sur. Trefoil Family Factor 2 Is Expressed in Murine Gastric and Immune Cells and Controls both Gastrointestinal Inflammation and Systemic Immune Responses. 2006;75(1):4714–480.
17. Marsha Wills-Karp M, Reena Rani R, Krista Dienger K, Ian Lewkowich I, James G. Fox JG, Charles Perkins P, i sur. Trefoil factor 2 rapidly induces interleukin 33 to promote type 2 immunity during allergic asthma and hookworm infection. *JEM* 2012;209(3):607-622.
18. McBerry C, Egan CE, Rani R, Yang Y, Wu D, Boespflug N, i sur. Trefoil factor 2 negatively regulates type 1 immunity against *Toxoplasma gondii*. *J Immunol*. 2012;189(6):3078-84.
19. Greeley MA, Van Winkle LS, Edwards PC, Plopper CG. Airway trefoil factor expression during naphthalene injury and repair. *Toxicol Sci*. 2010;113(2):453-67.
20. McKenzie C, Thim L, Parsons ME. Topical and intravenous administration of trefoil factors protect the gastric mucosa from ethanol-induced injury in the rat. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000;14(8):1033-40.
21. Judd LM, Chalinor HV, Walduck A, Pavlic DI, Däbritz J, Dubeykovskaya Z, i sur. TFF2 deficiency exacerbates weight loss and alters immune cell and cytokine profiles in DSS colitis, And this cannot be rescued by wild-type bone marrow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;308:12-24.
22. Shah AA, Leidinger P, Keller A, Wendschlag A, Backes C, Baus-Loncar M, i sur. The intestinal factor Tff3 and a miRNA network regulate murine caloric metabolism. *RNA Biol*. 2011;8(1):77-81.
23. Ge H, Gardner J, Wu X, Rulifson I, Wang J, Xiong Y, i sur. Trefoil factor 3 (TFF3) is regulated by food intake, improves glucose tolerance and induces mucinous metaplasia. *PLoS One*. 2015;10(6):e0126924.

24. Guillén N, Navarro MA, Arnal C, Noone E, Arbonés-Mainar JM, Acín S, i sur. Microarray analysis of hepatic gene expression identifies new genes involved in steatotic liver. *Physiol Genomics*. 2009;37(3):187-98.
25. Xue Y, Shen L, Cui Y, Zhang H, Chen Q, Cui A, i sur. Tff3, as a novel peptide, regulates hepatic glucose metabolism. *PLoS One*. 2013;8(9):e75240.
26. Barrera Roa GJ, Tortolero GS, Gonzalez JE. Trefoil factor 3 (TFF3) expression is regulated by insulin and glucose. *Journal of Health Sciences* 2013;3(1);1-12.
27. Fueger PT, Schisler JC, Lu D, Babu DA, Mirmira RG, Newgard CB, i sur. Trefoil factor 3 stimulates human and rodent pancreatic islet beta-cell replication with retention of function. *Mol Endocrinol*. 2008;22(5):1251-9.
28. Dhar DK, Wang TC, Tabara H, Tonomoto Y, Maruyama R, Tachibana M, i sur. Expression of trefoil factor family members correlates with patient prognosis and neoangiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(18):6472-8.
29. Im S, Yoo C, Jung JH, Choi HJ, Yoo J, Kang CS. Reduced expression of TFF1 and increased expression of TFF3 in gastric cancer: correlation with clinicopathological parameters and prognosis. *Int J Med Sci*. 2013;10(2):133-40.
30. Qu Y, Yang Y, Ma D, Xiao W. Increased trefoil factor 3 levels in the serum of patients with three major histological subtypes of lung cancer. *Oncol Rep*. 2012;27(4):1277-83.
31. Vestergaard EM, Borre M, Poulsen SS, Nexø E, Tørring N. Plasma levels of trefoil factors are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:807-12.
32. Okada H, Kimura MT, Tan D, Fujiwara K, Igarashi J, Makuuchi M, i sur. Frequent trefoil factor 3 (TFF3) overexpression and promoter hypomethylation in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*. 2005;26(2):369-77.
33. May FE, Westley BR. TFF3 is a valuable predictive biomarker of endocrine response in metastatic breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2015;22(3):465-79.
34. Huang Z, Zhang X, Lu H, Wu L, Wang D, Zhang Q, i sur. Serum trefoil factor 3 is a promising non-invasive biomarker for gastric cancer screening: A monocentric cohort study in China. *BMC Gastroenterology* 2014;14:74
35. Liu SQ, Tefft BJ, Roberts DT, Zhang LQ, Ren Y, Li YC, i sur. Cardioprotective proteins upregulated in the liver in response to experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;303(12):H1446-58.
36. Liu SQ, Roberts D, Zhang B, Ren Y, Zhang LQ, Wu YH. Trefoil factor 3 as an endocrine neuroprotective factor from the liver in experimental cerebral ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*. 2013;8(10):e77732.

37. Podolsky DK, Gerken G, Eyking A, and Cario E. Colitis-associated variant of TLR2 causes impaired mucosal repair due to TFF3 deficiency. *Gastroenterology*. 2009;137(1):209-220.
38. Paulsen FP, Woon CW, Varoga D, Jansen A, Garreis F, Jäger K, i sur. Intestinal trefoil factor/TFF3 promotes re-epithelialization of corneal Wounds. *J Biol Chem*. 2008; 283(19):13418-13427.
39. Hoffmann W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(24):2932-42.
40. Royce SG, Li X, Tortorella S, Goodings L, Chow BS, Giraud AS, i sur. Mechanistic insights into the contribution of epithelial damage to airway remodeling. Novel therapeutic targets for asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014;50(1):180-92.
41. Agius L, Peak M, Alberti KG. Regulation of glycogen synthesis from glucose and gluconeogenic precursors by insulin in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Biochem J*. 1990; 266(1): 91-102.

11. ŽIVOTOPIS

Kristina Ivić, studentica 6. godine
Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeka
Medicinski fakultet Osijek
Studij medicine
Cara Hadrijana 10E
Tel. +38531512800

Datum i mjesto rođenja:
22. 8. 1991., Osijek

Kućna adresa:
Kolodvorska 100, 31431 Čepin
Tel. +385993790490
E-mail: kika.ivic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

1998. – 2006. Osnovna škola Miroslava Krležu u Čepinu
2006. – 2010. Matematička (III.) gimnazija u Osijeku
2010. – 2016. Medicinski fakultet u Osijeku, Studij medicine